

唾液基因组学进展及对干燥综合征的研究

袁雅琪 汪 悦

摘 要 唾液是人体重要的外分泌液之一,其中蕴含着丰富的生物信息,为反映全身疾病敞开了大门。利用唾液作为诊断样品提供样品采集的疾病筛查一种无创性、低成本的方法,对专业性要求不高,适合普及。转录组分析,迄今已取得的敏感度和特异性方面最大的进展,以及对临床实施进度。高性价比的室温稳定分析方法,核酸预扩增技术和直接唾液转录分析近期的发展已使唾液中发现的准确的检测和定量。在这里,我们就干燥综合征患者唾液中基因组学的应用做一个回顾性研究。

关键词 唾液检测 干燥综合征 基因组学

[中图分类号] R593

[文献标识码] A

唾液由腮腺、颌下腺、舌下腺、还有数以百计的小唾液腺的分泌物及牙龈龈沟液等组成,其成分复杂,包括各种蛋白质、酶类及细胞碎片等各类小分子。随着新型蛋白质的稳定方法的出现,唾液蛋白组学检测发展迅速,口腔唾液蛋白成分含量的变化被发现同口腔疾病、风湿免疫疾病及肿瘤疾病等有密切关系^[1-4]。近年来,唾液检测的重点放在了基因组学研究方面,尤其是转录组学,其敏感度和特异性方面取得了重大的发展。干燥综合征(Sjögren's syndrome, SS)是一种以淋巴细胞增殖和外分泌腺体进行性的损伤为特征的慢性自身免疫病。临床上除有涎腺、泪腺等外分泌腺功能受损以外,也可出现皮肤、肾脏、肺脏、消化系统、神经系统及血液系统等多系统、多脏器受累,随着科学的发展和免疫诊断技术的提高,SS逐渐成为人群中较为常见的自身免疫性疾病,发生率0.1%~4.6%^[5]。SS的病因和发病机制尚不明确,现代医学多认为和免疫细胞异常、遗传因素、病毒感染、雌激素作用等密切相关。本文就基因组学在干燥综合征唾液中的表达和生物标志物应用等方面做一综述。

一、唾液基因组学研究的发展

1. 唾液基因组学的发展:在过去的10年里,全基因组关联(genome-wide association, GWA)扫描的出现,发现了新的风险位点,改变了我们对疾病发病机制的认识。唾液的基因组学可以直接反应病原体的入侵或者病理遗传过程,如癌细胞的基因转录等等。唾液比血液及尿液等其他体液中获取的DNA的质量

和产量都比较好,且存储时间相对长,降解不显著^[6,7]。唾液中基因组学的检测一般用于反应特定基因的存在情况,但不能提供相关基因表达上调或下调的信息。mRNA(messenger RNA)和miRNA(micro RNA)是由细胞中转录产生后分泌到细胞外存在于人体体液中的一种小分子物质,因其稳定性和特异性,作为生物标志物的潜力被不断挖掘。近2年来, Lee等^[8]开发的直接唾液转录组分析技术,直接在室温操作,缩短了操作时间,简化了mRNA提取过程,为唾液mRNA检测的试验科研和投入临床使用加快了进程。全基因组基因表达分析是一种功能强大的技术,让成千上万的mRNA转录物样品可以同时测量。自2005年以来,利用微阵列技术(又称基因芯片)高通量转录谱从正常和病变组织特征基因表达的能力已经大大增强。例如,微阵列技术已经广泛地用于肿瘤学来定义异常调节途径并提示预后的情况^[9]。微阵列技术已经允许高通量唾液分析,唾液转录组是使用微阵列技术和实时定量PCR(qPCR)验证。然而,由于某些生物标志物和部分的小样品体积、低浓度等影响,新的技术仍待研发^[10]。

2. 唾液基因组学在临床工作中的应用:唾液基因组学已被用于肿瘤、免疫等疾病的早期诊断和判断预后上。恶性肿瘤的发生和发展是由特定的遗传信息传导。Li等对口腔癌患者的唾液进行基因芯片筛查,发现了多个mRNA的异常表达,其中白细胞介素1- β (IL1- β)、白介素8(IL-8)、鸟氨酸脱羧酶抗酶1(OAZ1)和丝氨酸乙酰转移酶(SAT)这4个表达升高明显,因此提出这4个是可作为患者的T1和T2口腔癌的生物标志物,用于早期诊断^[11]。另一方面,肿瘤诱导病毒,如人类免疫缺陷病毒(HIV)的

DNA 和人疱疹病毒(HHV - 8)也被发现在肿瘤患者唾液中异常表达,有望用于肿瘤的风险评估^[12]。幽门螺杆菌 DNA 在唾液检测中敏感度高达 85%,可作为消化性溃疡和幽门螺杆菌感染导致的慢性胃炎诊断参考^[13]。

二、干燥综合征唾液的基因表达

1. 干燥综合征的表现基因组学研究:在 SS 患者的唾液中,早期发现了一些基因产物包括 IL - 2、IL - 6、anti - Ro/SSA、anti - La/SSB、 β_2 - 微球蛋白(β_2 - m)、反 α - 胞衬蛋白抗体^[14,15]。然而,这些产物没有敏感度或特异性,一般用于 SS 的验证性诊断^[14]。Shen 博士通过原发性干燥综合征(pSS)患者和正常人进行对照,发现原发性 SS 患者唾液样本中发现有 162 个 mRNA 差异性表达,经过筛选有 13 个 mRNA 包括 GIP2、B2M、IFIT2、IFIT3、IL18、COP1 等被实时定量 PCR(RT - PCR)验证,显著上调(>10 倍的变化)^[15]。更有意思的是其中 37 个基因都曾被验证为干扰素诱导基因,支持了 IFN - 1 通路在干燥综合征中所起的核心作用,同时表明了 pSS 患者的唾液可能参与了干扰素通路^[16]。除了干扰素诱导基因, I 类主要组织相容性复合体的上调基因亦被发现在 pSS 患者的唾液和唾液腺中^[17]。此外, Hjelmervik 等通过唾液腺和唾液的基因筛查发现蛋白酶体亚基 β 型 9、鸟苷酸结合蛋白 2、IFN - γ 诱导蛋白 44 和 IFN - α 诱导蛋白 GIP2 等表达异常^[18]。

2. 干燥综合征唾液 miRNA 的基因组学:miRNAs 是一类短小的(9 ~ 25 个寡核苷酸)的非编码 RNA。成熟 miRNA 通过核酸序列互补识别靶 mRNA 的 3' UTR 区,在转录后水平抑制靶 mRNA 表达,从而抑制蛋白质的合成,达到调控基因表达的目的^[19]。miRNA 在细胞生长、分化、凋亡,病原 - 宿主相互作用和应激反应等多方面发挥作用,近年研究发现 miRNA 对机体免疫细胞具有多种调控功能,在固有免疫及适应性免疫中发挥重要作用,并参与自身免疫病的发病机制。miRNA 性质比 mRNA 更稳定,其被证实包裹在外来体(30 ~ 100nm 的直径和内吞原点这些膜结合的微泡)中,体液如血液衍生物和唾液或尿液成为 miRNA 的理想来源^[20]。唾液中的 miRNA 检测在肿瘤领域有较丰硕的成果, Park 等在口腔癌患者唾液中与对照组的对照中发现 miR - 125a 和 miR - 200a 的水平显著降低(已知的肿瘤抑制基因)^[21]。2012 年 Alevizos 的团队首次采用新基因测序技术(NGS)并用 TaqMan 定量 PCR 验证了 SS 患者唾液腺

中新的 miRNA 的存在,包括 MIR - 4524b - 3P、MIR - 4524b - 5P、MIR - 5571 - 3P、MIR - 5571 - 5P、MIR - 5100 和 MIR - 5572。此前他们在预实验中证实唾液中可以提取到 miRNA,与 SS 患者唇腺组织中表达谱有相同的表达趋势。

三、展望

随着基因组学、转录组学的发展,在临床和研究设置唾液测试在迅速开展起来,逐渐成为认识疾病的一种实用和可靠的手段。使用唾液作为诊断标本避免了与传统的样品采集的方法,如血液取样或组织活检引起的疼痛、焦虑和感染的风险。唾液取样也有利于对疾病的监测多个后续样本的收集。然而,进一步的详细研究,通过比较唾液与其他体液确定唾液的诊断价值,这需要评估唾液的详细的预后和诊断价值。在基因组学方面大部分报告都只是初步的,在临床水平测试之前需进一步测试。基因芯片技术难操作性、临床样本量不足以及试剂等的成本原因,都局限了唾液检测技术的普及。因此了解唾液基因生物标志物的来源将是唾液诊断未来发展的方向。

参考文献

- 1 Sexton WM, Lin Y, Kryscio RJ, *et al.* Salivary biomarkers of periodontal disease in response to treatment[J]. J Clin Periodontol, 2011, 38:434 - 441
- 2 Michaud K. Edidemiological studies in incidence, prevalence, mortality and comorbidity of the rheumatic diseases[J]. Arthritis Research and Therapy, 2009, 2: 229
- 3 Giusti L, Baldini C, Federica Ciregia F, *et al.* Is GRP78/BiP a potential salivary biomarker in patients with rheumatoid arthritis[J]. Proteomics Clin, 2010, 4(3): 315 - 324
- 4 张娜, 李宝全. 血清和唾液抗核小体抗体在系统性红斑狼疮中的诊断意义[J]. 天津医科大学学报, 2007, 13(3): 363 - 366
- 5 Gabrel SE, Michaud K. Edidemiological studies in incidence, prevalence, mortality and comorbidity of the rheumatic diseases[J]. Arthritis Res Ther, 2009, 11: 229
- 6 Fabian TK, Fejerdy P, Cserehely P. Salivary genomics, transcriptomics and proteomics: the emerging concept of the oral ecosystem and their use in the early diagnosis of cancer and other diseases[J]. Curr Genomics, 2008, 9: 11 - 21
- 7 Nunes AP, Oliveira IO, Santos BR, *et al.* Quality of DNA extracted from saliva samples collected with the oragene DNA self - collection kit[J]. BMC Med Res Methodol, 2012, 12: 65
- 8 Lee YH, Zhou H, Reiss JK, *et al.* Direct saliva transcriptome analysis[J]. Clin Chem, 2011, 57: 1295 - 1302
- 9 Staudt LM. Gene expression profiling of lymphoid malignancies[J]. Annu Rev Med, 2002, 53: 303 - 318
- 10 Hu Z, Zimmermann BG, Zhou H, *et al.* Exon - level expression profiling: a comprehensive transcriptome analysis of oral fluids[J]. Clin

Chem,2008,54:824-832

- 11 Li Y, St John MAR, Zhou X, *et al.* Salivary transcriptome diagnostics for oral cancer detection[J]. Clin Cancer Res,2004,10:8442-8450
- 12 Vieira J, Huang ML, Koelle DM, *et al.* Transmissible Kaposi's sarcoma-associated Herpesvirus (Human herpesvirus 8) in saliva of men with a history of Kaposi's sarcoma[J]. J Virol,1997,71:7083-7087
- 13 Loeb MB, Riddel RH, James C, *et al.* Evaluation of salivary antibodies to detect infection with helicobacter pylori[J]. Can J Gastroenterol,1997,11:437-440
- 14 Castro J, Jimenez-Alonso J, Sabio JM, *et al.* for the Grupo Lupus Virgen de las Nieves Salivary and serum $\beta 2$ -microglobulin and γ -glutamyl-transferase in patients with primary Sjögren syndrome and Sjögren syndrome secondary to systemic lupus erythematosus[J]. Clin Chim Acta,2003,334:225-231
- 15 Ben-Chetrit EF, Rubinow A. Anti-SSA/Ro and anti-SSB/La antibodies in serum and saliva of patients with Sjögren's syndrome[J]. Clin Rheumatol,1993,12:471-474
- 16 Hu S, Wong DT. Salivary proteomic and genomic biomarkers for primary Sjögren's syndrome[J]. Arthritis Rheum,2007,56(11):3588

-3600

- 17 Sanda C, Weitzel P, Tsukahara T, *et al.* Differential gene induction by type I and type II interferons and their combination[J]. J Interferon Cytokine Res,2006,26:462-472
- 18 Gottenberg JE, Cagnard N, Lucchesi C, *et al.* Activation of IFN pathways and plasmacytoid dendritic cell recruitment in target organs of primary Sjögren's syndrome[J]. Proc Natl Acad Sci US A,2006,103:2770-2775
- 19 Hjelmervik TO, Petersen K, Jonassen I, *et al.* Gene expression profiling of minor salivary glands clearly distinguishes primary Sjögren's syndrome patients from healthy control subjects[J]. Arthritis Rheum,2005,52:1534-1544
- 20 Battel DP. MicroRNAs, target recognition and regulatory functions[J]. Cell,2009,136(2):215-233
- 21 Gallo A, Tandon M, Illei GG. The majority of microRNAs detectable in serum and saliva is concentrated in exosomes[J]. PLoS One,2012,7(3):e30679

(收稿日期:2014-02-19)

(修回日期:2014-02-25)

T 细胞相关细胞因子在干燥综合征发病机制的研究进展

李 忱 孙 莹 董振华 韩志超

[中图分类号] R593

[文献标识码] A

干燥综合征(Sjögren syndrome, SS)是一种以唾液腺和泪腺为主要靶器官的自身免疫性疾病,我国发生率约 0.33%~0.77%,临床除有涎腺和泪腺受损功能下降而出现口干、眼干外,尚有其他外分泌腺及腺体外其他器官受累而出现皮肤、骨骼肌肉、肾脏、肺脏、消化系统、神经系统等多系统损害,严重影响患者生活质量。效应 T 细胞可增强 B 细胞活化,促进自身抗体产生,介导靶器官的自身免疫反应。在 SS 患者的靶器官和血液中,效应 T 细胞及其多种细胞因子数量明显增加。不同的效应 T 细胞亚群(如 Th1、Th2、Th17 细胞以及滤泡性辅助性 T 细胞)在多种细胞因子的诱导下分化,并产生细胞因子促进相同细胞

亚群的分化。Th1、Th2 和 Th17 细胞的特征性细胞因子是 IFN- γ 、IL-4 和 IL-17,这些细胞因子的调节、分化、扩增对 SS 的发病机制的研究十分必要。本文在这篇综述中,复习并总结多种细胞因子在 SS 发病机制研究的同时,着重关注了效应 T 细胞产生的细胞因子和 T 细胞直接相关的免疫应答。

一、Th1 细胞相关的细胞因子

1. IFN- γ : IFN- γ 是 Th1 和 CD8⁺ T 细胞特征细胞因子,主要由活化的 Th 细胞和 NK 细胞产生,参与免疫调节主要表现为促进 Th1 细胞发育和抑制 Th2 细胞活化与增殖。SS 患者唾液腺、唾液和血清中可见 IFN- γ 水平升高,提示以 Th1 细胞活化为主^[1]。Cha 等^[2]发现 IFN- γ 缺失可阻止免疫异常,从而避免了后续的靶器官损害。Baker 等^[3]的研究表明在 SS 患者唾液腺细胞中 IFN- γ 可诱导细胞凋亡,引起腺体分泌功能不全。其机制可能是由于 IFN- γ 诱导 CXCR3 配位体的血清趋化因子 CXCL9 和 CXCL10

作者单位:中国医学科学院/中国协和医科大学北京协和医院中医科(李忱、孙莹、董振华);100021 北京,国家食品安全风险评估中心(韩志超)

通讯作者:董振华,电子信箱:pumcdzh@163.com